

《様式B》

研究テーマ 「耐性菌を克服する光を用いた革新的抗菌療法：IgY 抗体を用いた光抗菌療法(IgY-PAT)の開発」

研究責任者 所属機関名 名古屋大学高等研究院/医学系研究科病態内科学講座呼吸器内科

官職又は役職 S- YLC 特任助教

氏 名 佐藤 和秀 メールアドレス k-sato@med.nagoya-u.ac.jp

共同研究者 所属機関名

官職又は役職

氏 名

(平成 28 年度募集) 第 29 回 助成研究 完了報告書

上記様式記載後

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1, 000 字程度)

※産業技術として実用化の可能性や特許出願 (予定も含む) の有無についてもご記載ください。

光免疫療法 (PIT) はモノクローナル抗体に光感受性物質 IR700 を結合させたものを癌細胞に反応させた後に、近赤外光を照射して選択的に癌細胞膜を破壊する、新しい癌治療法である。EGFR を標的とした頭頸部癌に対して臨床試験もされており、良好な成績をおさめ、現在第 3 相臨床試験が行われている。

ニワトリ卵黄免疫グロブリン (IgY) 抗体は、産卵ニワトリにおける主な免疫グロブリンであり、受動免疫を付与するために血清から卵黄に移行する。IgY は鶏卵から採取されるため、高濃度で容易に収集することができる。また、IgY は抗生物質とは対称的に、副作用や耐性、毒性残留物を示さない。そのため IgY 抗体は抗生物質とは異なった新たな感染症抑制として注目されている。In vitro, in vivo 実験において、特異的 IgY 抗体により大腸菌、腸炎菌型サルモネラ・エンテロコリチカ、ネズミチフス菌型サルモネラ・エンテロコリチカ、ガリバクテリウム・アナリスなどの病原菌の抑制効果が報告されている。

今回我々は、PIT を感染症治療に応用できるかについて、光抗菌療法 (photoantibiotic therapy; PAT) の検討を行った。癌細胞と異なり菌量や増殖速度の点から大量の抗体が必要になるため、安価で大量に作成可能な IgY 抗体を用い、IgY 抗体の抗菌効果を増強するために PAT を組み合わせた IgY-PAT 療法の開発を目標とした。

具体的には、C. albicans に対する anti-C. albicans IgY (CA-IgY) に IR700 を結合し、抗体付加物 (CA-IgY-IR700 と仮称) を作成する。C. albicans にと結合させた後、近赤外光をあてて C. albicans を障害するモデルを vivo, vitro で作成する。

CA-IgY と IR700 dye を結合し、SDS-PAGE, Western Blotting で QC 行い、CA-IgY と IR700 dye との結合が確認できた。次いで、C. albicans との反応性と PIT 効果について in vitro にて評価を行った。C. albicans に対しての結合について、フローサイトメトリーで 700nm の波長を測定し、対象としてヒト皮膚癌細胞 A431 を用いた。C. albicans では 700nm 波長が確認できるのに対して、A431 細胞では確認されなかった。

CA-IgY-IR700 を反応後に近赤外光を当て、PIT の効果について PI dye を用いたフローサイトメトリーと、コロニー計測で行った。J をあげると段階的に死細胞率が高まり、また、コロニー数が低下することが確認された。また、共焦点顕微鏡、走査電子顕微鏡を用いて、視覚的にも C. albicans に対しての PIT の効果を確認した。

今後はマウスを用いた in vivo 実験を行うことを予定している。

## (1) 研究テーマ

「耐性菌を克服する光を用いた革新的抗菌療法：IgY 抗体を用いた光抗菌療法(IgY-PAT)の開発」

## (2)実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要

### 研究の目的

肺炎は日本の第4位の死因であり、特に基礎疾患のある患者さんでの**抗生剤の耐性化が問題**となっており、**その対策が急務**となっている。多剤耐性化が進んでおり、申請者は感染症を扱うことの多い呼吸器内科医として臨床の現場において数々の壁にぶつかってきた。

### 挑戦

この状況を克服するために、**従来の抗生剤開発の概念を超越する革新的な抗菌療法が求められている**。特に、難治である真菌感染症をモデルに、現状の抗真菌剤とは異なった作用機序・耐性菌を作らない、新しい発想の**新規抗菌療法を開発する**(図1)。

### 内容

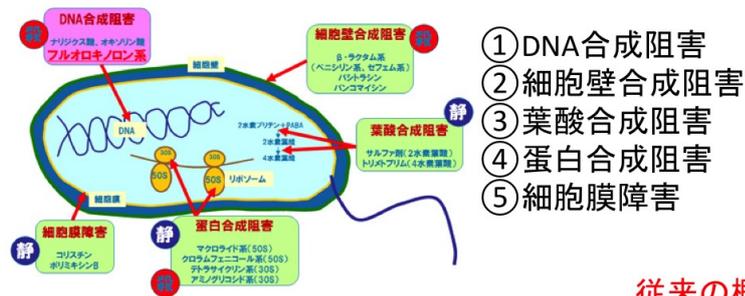
ニワトリの免疫グロブリンには、現在までに IgG、IgM、IgA の3つのグロブリンクラスの存在が確認されている。IgG は、大量に卵黄(Yolk)に含まれ、また、ほ乳類のIgG と共通抗原性がなく、種々の異なる物理化学的性質を持つことから、鳥類では IgY と呼ばれている。これら IgY、IgM、IgA は、ニワトリ血清中に各々7.0mg/ml、3mg/ml、0.6mg/ml 程度存在することが知られている。ところが卵では、IgM、IgA は卵白に局在、卵黄には IgY のみが存在する。これらは親鳥からの移行抗体であり、卵黄の IgY は、血中 IgY が卵巣の上皮を通過して卵母細胞に取り込まれることによって卵黄へ移行し蓄積されおり、このとき卵黄中の IgY 含量はおよそ 10mg/m と血清よりも高濃度に濃縮蓄積されている。従って、卵性動物である鳥類が持つ特徴的な母子免疫機構を利用すれば、感作したニワトリの卵から、抗原特異的 IgY を、比較的簡単にかつ大量に調製することができる。これは、抗体の精製にあたり、動物にとっても出血を伴わず、負担がなくてよい(図2)。

また、IgY は抗生物質とは対称的に、副作用や耐性、毒性残留物を示さない。そのため IgY 抗体は抗生物質とは異なった新たな感染症抑制として注目されている。In vitro, in vivo 実験において、特異的 IgY 抗体により大腸菌、腸炎菌型サルモネラ・エンテロコリチカ、ネズミチフス菌型サルモネラ・エンテロコリチカ、ガリバクテリウム・アナリスなどの病原菌の抑制効果が報告されている。

今回我々は、PIT を感染症治療に応用できるかについて、光抗菌療法(photoantibiotic therapy; PAT)の検討を行った。癌細胞と異なり菌量や増殖速度の点から大量の抗体が必要になるため、安価で大量に作成が可能な IgY 抗体を用い、IgY 抗体の抗菌効果を増強するために PAT を組み合わせた IgY-PAT 療法の開発を目標とした。

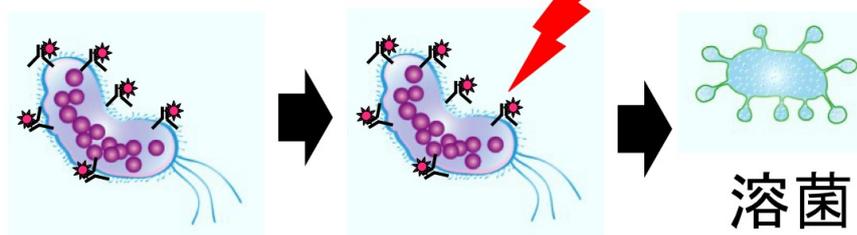
具体的には、C.albicans に対する anti-C.albicans IgY (CA-IgY)に IR700 を結合し、抗体付加物(CA-IgY-IR700 と仮称)を作成する。C.albicans にと結合させた後、近赤外光をあてて C.albicans を障害するモデルを vivo, vitro で作成した。

従来の抗生剤のターゲットとその作用機序



従来の概念を超越した  
新規抗菌療法の創出

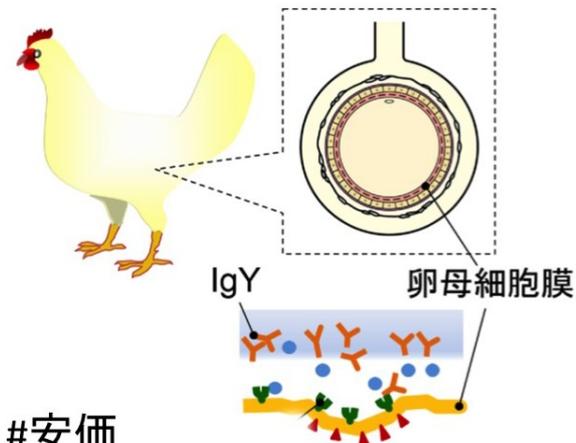
Photo-Antibiotic Therapy



光エネルギーによる直接菌体損傷。  
耐性化しにくい機序(物理的)。  
抗体を変える事で様々な細菌に対応可能。

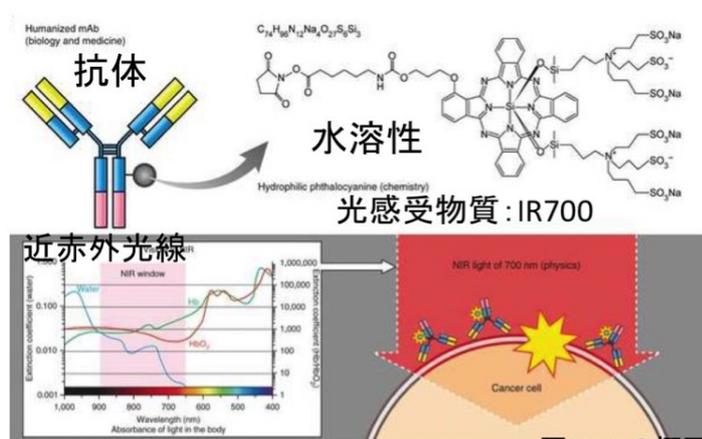
ブレイクスルー・イノベーション

図 1



- #安価
- #大量生産可能
- #人体への交差性少ない

図2:IgYの特徴



今後予想される効果

近年、細菌の耐性化は益々進んできており、抗生剤開発のイタチごっこが続いてしまっている。

これまでと、全く機序の異なる新規治療法を開発する事で、感染症治療へのインパクトはかなり高いと考えられる(図 1)。耐性化は難治化・致死的结果を生む為に、感染症臨床領域への影響は大きいと考えられ、学術的なインパクトのみならず感染症患者救済という社会的な意義も相当大きいと期待される。本研究が達成される場合には、将来の臨床応用を見据えて、呼吸器・感染症治療のブレイクスルーとなりうる。また、

安価に大量生産できる IgY を用いる事で、安く使用できる、抗菌療法の開発と産業化につなげる。

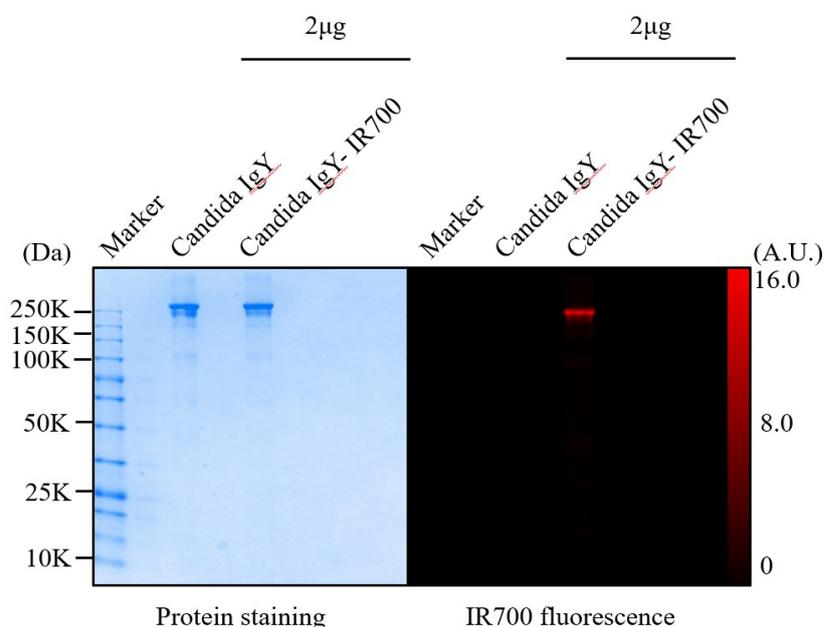
### (3) 実施内容および成果の説明

#### 1) CA-IgY-IR700 の作成

*C. albicans* と CA-IgY については IRIG 岐阜免疫研究所より提供された。

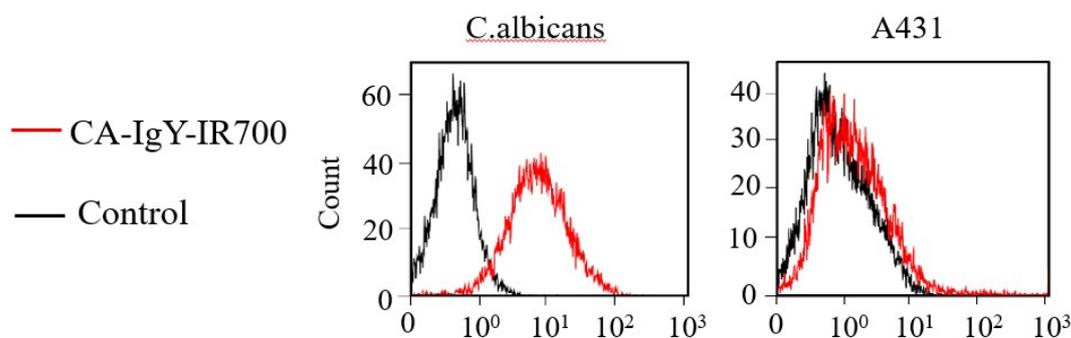
CA-IgY と IR700 dye を結合し、SDS-PAGE, Western Blotting で QC 行った。

CA-IgY-IR700 では Protein staining と 700nm 蛍光を同位置に認めて結合している一方、CA-IgY では Protein staining は確認されるが、700nm 波長では観察できなかった。以上のことから CA-IgY-IR700 の作成が成功した。1分子の IgY に IR700 が 2-3分子結合していることが判明した。



#### 2) *C. albicans* を標的とした特異的結合の確認

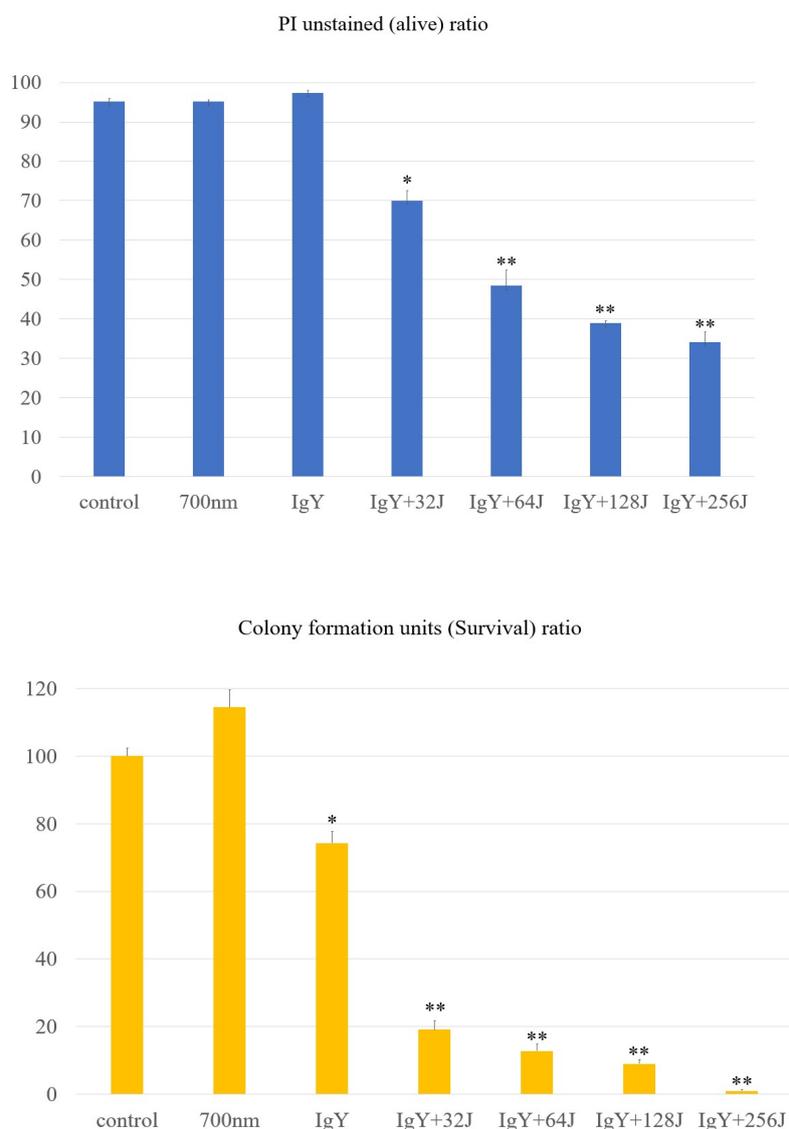
*C. albicans* に対しての結合について、抗体と *C. albicans* を反応させたのちフローサイトメトリーで 700nm の波長を測定し、陰性対象としてヒト皮膚癌細胞 A431 を用いた。抗体濃度を事前検査でためし、CA-IgY-IR700 を 200 μg/mL で 37 度 1 時間で反応させて測定したところ、*C. albicans* では蛍光を認めるのに対して、A431 細胞では蛍光を認めなかった。以上のことから、CA-IgY-IR700 はヒト細胞には結合せず、*C. albicans* に結合することが判明した。



### 3) *C. albicans* を標的とした In Vitro PAT の検討

CA-IgY-IR700 を反応後に近赤外光を当て、PIT の効果について死細胞染色 (Propidium Iodide: PI) を用いたフローサイトメトリーと、コロニー計測で行った。J をあげると段階的に死細胞率が高まり (生細胞率が低下し)、また、コロニー数が低下することが確認された。以上のことから、PAT がカンジダに対して殺菌的に働くことがわかり、光ドーズ依存的であった。

#### 【PAT 施行による *C. albicans* 生存率 ; FACS and CFUs】



### 4) *C. albicans* を標的とした In Vitro PAT の顕微鏡観察

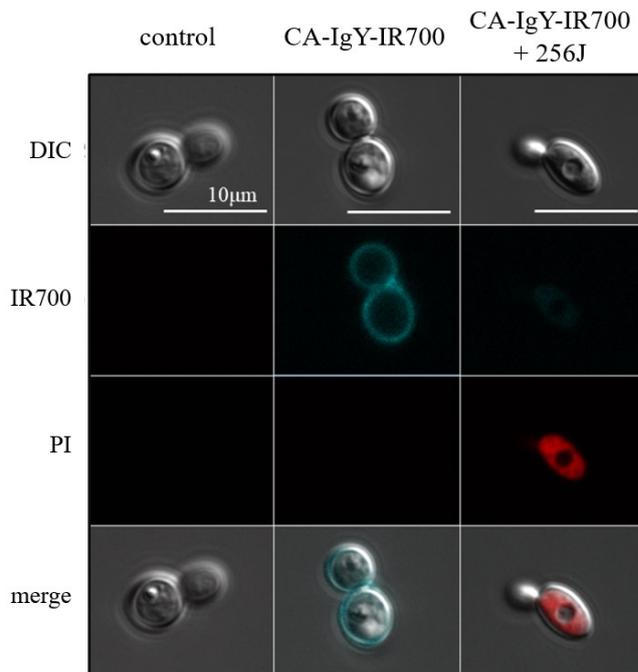
共焦点顕微鏡、走査電子顕微鏡を用いて、視覚的にも *C. albicans* に対しての抗体の反応性と、PIT による菌体の破壊を確認した。

共焦点顕微鏡画像では、CA-IgY-IR700 は 700nm の波長で蛍光を認め菌体に抗体が結合していることが確認された。また、PAT 施行後では死細胞染色である PI は陽性で、700nm の波長はわずかに観察できた。

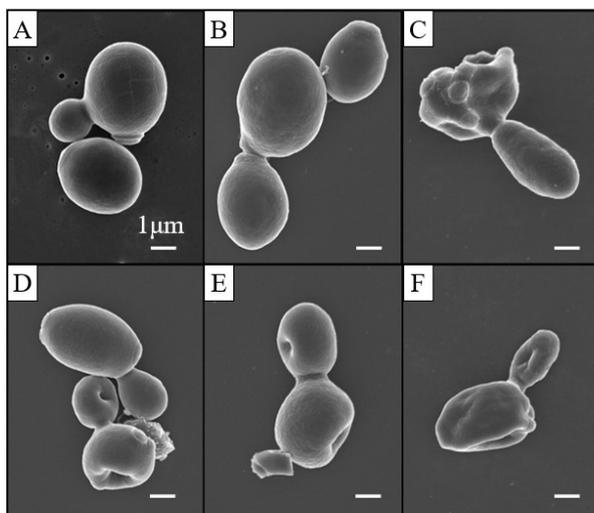
走査型電子顕微鏡では、control, 抗体反応のみの群では構造に変化を認めないが、

PAT を施行した群では表面構造の変形や穿孔、菌体全体の変形を来している *C. albicans* が多数観察できた。以上のことから、PAT による菌体表面への作用が直接観察できた。

**【共焦点顕微鏡画像】**



**【走査型電子顕微鏡画像】**



(A)Control, (B) CA-IgY-IR700  
(C~F) CA-IgY-IR700 + 256J

まとめ

IgY-PAT の効果を示すことができた。現在、ヒトへの応用に向けて動物実験で効果を検討中である。最終的にはヒトへの応用を実現したい。